

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-518041

(P2002-518041A)

(43)公表日 平成14年6月25日(2002.6.25)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 12 N 15/02		A 6 1 K 39/395	T 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395		47/48	4 B 0 6 4
47/48		A 6 1 P 13/08	4 B 0 6 5
A 6 1 P 13/08	35/00	35/00	4 C 0 7 6
35/00		C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-556004(P2000-556004)
(86) (22)出願日	平成11年6月17日(1999.6.17)
(85)翻訳文提出日	平成12年12月25日(2000.12.25)
(86)国際出願番号	PCT/US99/13713
(87)国際公開番号	WO99/67359
(87)国際公開日	平成11年12月29日(1999.12.29)
(31)優先権主張番号	09/104,717
(32)優先日	平成10年6月25日(1998.6.25)
(33)優先権主張国	米国(US)

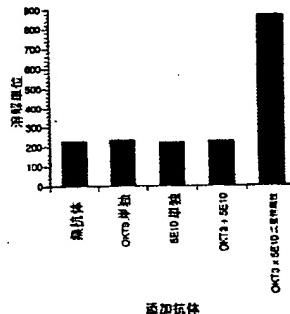
(71)出願人 ユニヴァーシティ・オブ・アイオワ・リサーチ・ファウンデーション  
アメリカ合衆国アイオワ州52242-5000.  
アイオワシティ・テクノロジー・イノヴェーション・センター214. オークデイル・リサーチ・キャンパス100. オークデイル・リサーチ・キャンパス  
(72)発明者 ワイナー ジョージ ジェイ  
アメリカ合衆国 アイオワ州 52246 アイオワ シティ ケネディ パークウェイ 235  
(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外9名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗癌細胞障害性リンパ細胞の再ターゲッティングのための二重特異性抗体およびそのためのハイブリドーマおよびモノクローナル抗体

(57)【要約】

抗体の一方のアーム上に全ての前立腺細胞に共通のマークーに対して結合特異性を有し、もう一方の抗体アーム上にT細胞マーカーCD3に結合特異性を有する二重特異性抗体。合併された特異性は腫瘍細胞及び、腫瘍細胞を殺すように再プログラムされた特異性を有するTエフェクター細胞を結びつける。in vitro研究により、二重特異性抗体は個々の抗体単独よりも高いレベルの細胞障害性を達成する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 1以上のポリペプチドを含む二重特異性抗原結合タンパク質構築物であって、前記結合タンパク質構築物が、

特定の非必須動物組織型の悪性および正常細胞の表面に発現している抗原決定基に対して結合特異性を有する第1の結合領域；および、

特定のクラスの免疫エフェクター細胞の表面に発現している抗原決定基に対して結合特異性を有する第2の結合領域、

を有することを特徴とする、前記結合タンパク質構築物。

【請求項2】 T-細胞に対して特異的な結合部位を更に有することを特徴とする、請求項1に記載の結合タンパク質構築物。

【請求項3】 第1および第2の結合領域が、特異的相補性決定領域を有するモノクローナル抗体またはその部分に含まれることを特徴とする、請求項1に記載の結合タンパク質構築物。

【請求項4】 第2の結合領域が、CD3、CD4、CD8、CD16、CD28、CD32およびCD64からなる群より選ばれるエフェクター細胞抗原決定基に対する結合特異性を有する、請求項1または2に記載の結合タンパク質構築物。

【請求項5】 第1の結合領域がモノクローナル抗体5E10の結合特異性を有する、請求項1または2に記載の結合タンパク質構築物。

【請求項6】 第1の結合領域がモノクローナル抗体5E10であり、第2の結合領域が、CD3、CD4、CD8、CD16およびCD28からなる群より選ばれるエフェクター細胞抗原決定基に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である、請求項5に記載のタンパク質構築物。

【請求項7】 OKT3分泌細胞(ATCCアクセッション番号CRL8001)と5E10分泌細胞とを融合させ、前記融合させた細胞を選択培地中で培養することによって調製されるハイブリッド-ハイブリドーマ細胞株。

【請求項8】 モノクローナルOKT3抗体、モノクローナル5E10抗体、およびOKT3と5E10モノクローナル抗体の合併特異性を有する二重特異性抗体を分泌するハイブリッド-ハイブリドーマ細胞株。

【請求項9】 特定の細胞型の癌の細胞表面に提示されている共通抗原決定

基に対する特異的モノクローナル抗体を產生する方法であって、

特定の組織型の複数の癌細胞に由来する個々の細胞株の細胞の全細胞懸濁混合物を調製すること、

前記細胞混合物を動物の体に注入することによって前記動物を免疫すること、

前記免疫された動物から前記共通抗原決定基に対する抗体を分泌するBリンパ細胞を回収し、前記Bリンパ細胞をミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを形成させること、

前記ハイブリドーマを増殖培地中でクローニングすること、

前記ハイブリドーマから前記分泌された抗体を含む培地上清を取り出すこと、

前記抗体をフローサイトメトリーで検出可能な標識で標識すること、

前記抗体を前記特定の組織型の癌細胞の混合物、および、前記癌細胞と異なる組織型の前記複数の非癌細胞と接触させること、

前記癌細胞および前記非癌細胞を前記抗体と、前記抗体が前記細胞に結合する条件下でインキュベーションすること、

フローサイトメトリーのために前記細胞を調製すること、

前記細胞をフローサイトメトリーで、その表面に標識抗体を結合している第1のクラス、および結合した抗体を有しない第2のクラスにソーティングすることにより、フローサイトメトリーにおいて二峰性分布を示す第1のスクリーニングテストを行なうこと、

前記第1のスクリーニングテストにおいて二峰性分布を示したモノクローナル抗体について、各癌および非癌細胞型を前記標識モノクローナル抗体で個別にテストして前記複数の癌細胞に対する結合特異性を有する抗体を同定することを含む第2のスクリーニングテストを行なうこと、および、

フローサイトメトリーにおいて前記二峰性を示したモノクローナル抗体について、特定の細胞型の複数の癌に由来する組織切片に対する前記標識抗体の結合特異性を決定することを含む第3のスクリーニングテストを行なうこと、  
を含む、前記方法。

【請求項10】 前立腺組織の細胞表面に提示されている共通抗原決定基に対する特異的モノクローナル抗体を產生する方法であって、

複数の前立腺癌細胞に由来する個々の細胞株の細胞の全細胞懸濁混合物を調製すること、

前記細胞混合物を動物の体に注入することによって前記動物を免疫すること、  
前記免疫された動物から前記共通抗原決定基に対する抗体を分泌するBリンパ細胞を回収し、前記Bリンパ細胞をミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを形成させること、

前記ハイブリドーマを増殖培地中でクローニングすること、  
前記ハイブリドーマから前記分泌された抗体を含む培地上清を取り出すこと、  
前記抗体をフローサイトメトリーで検出可能な標識で標識すること、  
前記抗体を前記特定の組織型の癌細胞の混合物、および、前記癌細胞と異なる組織型の前記複数の非癌細胞と接触させること、  
前記癌細胞および前記非癌細胞を前記抗体と、前記抗体が前記細胞に結合する条件下でインキュベーションすること、

フローサイトメトリーのための前記細胞を調製すること、  
前記細胞を、その表面に標識抗体を結合している第1のクラス、および結合した抗体を有しない第2のクラスにソーティングすることにより、フローサイトメトリーにおいて二峰性分布を示す第1のスクリーニングテストを行なうこと、  
前記第1のスクリーニングテストにおいて二峰性分布を示したモノクローナル抗体について、各癌および非癌細胞型を前記標識モノクローナル抗体で個別にテストして前記複数の癌細胞に対する結合特異性を有する抗体を同定することを含む第2のスクリーニングテストを行なうこと、および、  
フローサイトメトリーにおいて前記二峰性を示したモノクローナル抗体について、特定の細胞型の複数の癌に由来する組織切片に対する前記標識抗体の結合特異性を決定することを含む第3のスクリーニングテストを行なうこと、  
を含む、前記方法。

【請求項11】 非癌組織からの複数の細胞のそれぞれが、別個の細胞株から増殖されることによって得られる、請求項9に記載の方法。

【請求項12】 前立腺細胞と異なる組織型からの複数の細胞の各々が、別個の細胞株の増殖から得られる、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 請求項9に記載の方法によって得られるモノクローナル抗体または前記抗体の抗原結合特性を維持しているその断片、および、前記抗体に安定に結合した検出可能な標識を含む、組織学的切片中の癌細胞の検出のための診断試薬。

【請求項14】 標識が、酵素、放射性同位元素、および色素分子からなる群より選ばれる、請求項13に記載の診断試薬。

【請求項15】 請求項9に記載の方法によって得られるモノクローナル抗体または前記抗体の抗原結合特性を維持しているその断片、および、前記抗体に安定に結合した検出可能な画像化標識を含む、免疫シンチグラフにおいて癌細胞の検出のための診断試薬。

【請求項16】 画像化標識が、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ からなる群より選ばれる、請求項15に記載の診断試薬。

【請求項17】 請求項9に記載の方法によって得られるモノクローナル抗体または前記抗体の抗原結合特性を維持しているその断片、およびそれらに結合した細胞障害性部分を含む癌細胞の根絶のための治療薬剤。

【請求項18】 細胞障害性部分が、放射性核種、化学療法剤および生物学的トキシンからなる群より選ばれる、請求項17に記載の治療薬剤。

【請求項19】 請求項10に記載の方法によって得られるモノクローナル抗体または前記抗体の抗原結合特性を維持しているその断片、および、前記抗体に安定に結合した検出可能な標識を含む、組織学的切片中の前立腺細胞の検出のための診断試薬。

【請求項20】 標識が、酵素、放射性同位元素および色素分子からなる群より選ばれる、請求項19に記載の診断試薬。

【請求項21】 請求項10に記載の方法によって得られるモノクローナル抗体または前記抗体の抗原結合特性を維持しているその断片、および、前記抗体に安定に結合した検出可能な画像化標識を含む、免疫シンチグラフにおける前立腺癌細胞の検出のための診断試薬。

【請求項22】 画像化標識が、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ からなる群より選ばれる、請求項21に記載の診断試薬。

【請求項23】 請求項10に記載の方法によって得られるモノクローナル抗体または前記抗体の抗原結合特性を維持しているその断片、および前記抗体または前記断片に結合した細胞障害性部分を含む癌細胞の根絶のための治療薬剤。

【請求項24】 細胞障害性部分が、放射性核種、化学療法剤および生物学的トキシンからなる群より選ばれる、請求項23に記載の治療薬剤。

【請求項25】 5E10と命名された、前立腺由来細胞に特異的なモノクローナル抗体を分泌する、ATCCアクセッション番号XXXXXXに対応するハイブリドーマ。

【請求項26】 ATCCアクセッション番号XXXXXXを有する、5E10と命名されたハイブリドーマから得られる、正常および癌性前立腺由来細胞の表面の抗原決定基に特異性を有する精製モノクローナル抗体。

【請求項27】 請求項10に記載の方法によって得られる、前立腺由來の正常および癌細胞表面の抗原決定基に特異性を有する精製モノクローナル抗体。

【請求項28】 請求項9に記載の方法によって得られる、特定の組織型から生じる腫瘍細胞の表面上の共通決定基に対して特異的である精製モノクローナル抗体。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明はモノクローナル抗体およびその治療用途への利用の分野に関する。より詳細には、二重特異性抗体は前立腺組織マーカーに対する特異的結合性を有し、また、Tリンパ細胞の表面に存在するCD3抗原に対する特異性を有する。

**【0002】****(発明の背景)**

前立腺癌は男性にその数が増えつつある高度に難治性の疾病であり、米国において男性において最も頻度高く診断されるものとして肺癌を上回っている。前立腺癌は、腺の狭い領域に限定されていて、早期に発見された場合はしばしば治療可能であり、照射によって破壊され、またはそっくり外科的に除去される。不幸にも、非常に多くの前立腺癌は最初の検出前に既に周辺組織に浸潤するか遠方の部位、多くは骨髄に転移してしまっている。この例では、放射線照射および他の療法は医薬よりも苦痛を緩和するかもしれない。

**【0003】**

前立腺細胞の正常な発達および腫瘍増殖がどのようにアンドロジエンに依存するかが認識された後は、アンドロジエン遮断治療が全身性治療形態に提供されたように見えた。実際、性腺除去またはホルモン薬剤抑制の場合に劇的な症状の軽減および腫瘍縮退が観察される。このことに関してCharles Hugginsは1966年にノーベル賞を受賞した。しかしながら、アンドロジエン遮断の効果は一時的なものであり、癌はじきに新しいアンドロジエン非依存型細胞の出現を伴い再発し、それは異常に侵襲的であり全ての治療様式に対して耐性である。そのような例では、年齢の高い患者においてこの疾患の進行が比較的遅いことおよび他の病的過程の干渉のみが、そのような患者が避けられない癌の結果を免れることを可能とする。前立腺ガンの従来の治療に関する論点の一般的総説については、"Prostate Cancer Working Group", Coffey, D.S., Chair, Cancer Res., 51:1498 (1991)を参照せよ。

**【0004】**

アンドロジエン遮断は有用な治療法である。FDAに認可されているアンドロジエン抑制剤の中には、リン酸化非ステロイドエストロジエンであるスタイルホストロール(Stilphostrol)、GnRHの合成ノナペプチドアナログであるルプロン(Lupron)がある。一時的軽減に対する再発とアンドロジエン非依存性悪性細胞の出現は変動するものであり、ホルモン療法は多くの患者にしばらくの間継続的な苦痛の軽減を与える。少なくともある場合にはアンドロジエン非依存性細胞が異なる前癌細胞クローンから生じることが除外できないため、腫瘍細胞がそのアンドロジエン依存性をどのように克服するのか、また腫瘍細胞がそれを行うのかは分かっていない。

#### 【0005】

しかしながら、明らかに新しい治療法が必要とされている。過去数年間、前立腺癌をより頻度高く、より早期に検出しようとする重要な流れが存在しており、これは前立腺特異的抗原(PSA)の定量に関するより感度のよい正確な試験が利用できることになったことによって主として生じたものである。これに伴い、前立腺癌発現の分子生物学に関してより多くが知られるようになったが、それらの分子的発見が効果的な治療法にどのように翻訳されるか明確でない。例えば、初期悪性細胞のアンドロジエン依存性はAR遺伝子およびSRD5A2遺伝子に注意を集中させる。異常な遺伝子発現は、発現の改変につながる遺伝子増幅(AR)から生じることがあり、高リスク個体と関連した遺伝的多型(SRD5A2)から生じることがある。

Karpら、Cancer Res., 56: 5547 (1996)には分子的観察のいくつかに基づく潜在的治療法がいくつか記載されている。例えば、ステロイド5アルファレダクターゼ(Finansteride他)またはステロイドアロマターゼ(Exemestane他)による抗アンドロジエン/抗エストロジエン機構ターゲッティングは治療の可能性を与えるものである。また、細胞増殖を抑制する薬剤、例えばE-カドヘリン類似物、PD153035(EGFレセプター相互作用を介する)、またはフルアステロン(核酸合成の阻害)、は与えられた腫瘍中の分子的異常性が診断される場合には効果的かもしれない。

#### 【0006】

モノクローナル抗体は診断ツールおよび治療補助手段として腫瘍学において使

用されてきた。非結合(unconjugated)抗体は急性白血病の患者に使用されている（より最近の総説を参照せよ）。抗ガングリオシドモノクローナル抗体は何人のメラノーマ患者に使用され、ある程度の利益が得られている（Houghtonら、85:1242(1985)を参照せよ）。結合(conjugated)抗体に関しては、放射線核種を有するモノクローナルが評価されている。 $^{131}\text{I}$ および $^{90}\text{Y}$ は最も広範に研究されているが、これらはある程度の毒性を伴っている。他の結合抗体には、（リシン、S.トキシンその他のような）生物毒および（メトレキセートまたはドキソルビシンのような）化学療法剤が含まれる。

いくつかの前立腺一反応性抗体が作製され種々の程度で評価されてきた。もともと研究の進んだ抗体は7E11と命名され、PSMAと反応するものである。Kahnら、J. Urol., 152:1490 (1994)その他に記載されているように、放射標識された7E11は前立腺癌細胞と特異的に反応し、前立腺癌の見えない再発を有する患者の診断薬として有用であることが分かっている。臨床試験第Iフェーズにおける $^{111}\text{In}$ で標識されたこの抗体 (7E11-C5.3) の使用はMonoclonal Antibodies 2:Application in Clinical Oncology, A.A. Epenetos編集、第32章、Chapman & Hall Medical:1993で議論されている。しかしながら、この抗体はいくつかの制限を有している。この抗体は表面エピトープよりも寧ろ細胞内エピトープを認識し、従って、生細胞を標的にするにはその価値が制限される。従って、所望の特異性を有し、標的腫瘍細胞の表面に安定に発現している抗原分子のエピトープを標的とするモノクローナル抗体に対する大きな需要が存在する。

#### 【0007】

標的腫瘍細胞の破壊につながる免疫機構は部分的に分かれている。その表面にCD8+抗原決定部位を有する細胞障害性T細胞のある集団が同定されている。これらの細胞は活性化のためにCD4+ヘルパーリンパ細胞を必要とし、それは抗原プロセッシングおよび主要組織適合性抗原複合体と会合して提示することによって媒介される複雑な事象である。抗原プロセッシングは腫瘍抗原を標的とする細胞のみが活性化されることを保証する。

Tリンパ細胞のサブ集団上の種々のマーカーに向けられたモノクローナル抗体が免疫エフェクター細胞を活性化させるために使用されている。例えば、注射に

よって投与されたOKT3抗体はCD3と出会い、IL-2、TNF- $\alpha$ およびIL-6放出、組織損傷およびT細胞活性の活性化または抑制を含む一連の免疫効果全体を生じさせる。より最近では、OKT3特異性は二重特異性抗体において抗腫瘍特異性と組み合わされた。Linkら、Blood, 81:3343 (1993)はOKT3の1本のアームとB細胞悪性抗原に向けられた他のアームを有する二重特異性抗体が標的腫瘍細胞に細胞障害性を誘導することができることを示した。興味深いことに、このT細胞活性化はT細胞の天然の特異性と関係なく、腫瘍細胞の存在を必要とした。従って、腫瘍細胞およびエフェクター細胞の同一の抗体による同時結合において、T細胞は一般T細胞集団から効果的にリクルートされ、腫瘍細胞を破壊すべく再ターゲッティングされる。

#### 【0008】

また、Weiner, Int. J. Cancer, 補遺7、63(1992)により、二重特異性抗体の作用はIL-2の共投与により増強され、その結果、組合せ治療は抗腫瘍モノクローナル抗体単独の100~1000倍大きな腫瘍負荷を取り扱えるようになる。あるいは、二重特異性抗体の使用において観察される同時刺激は抗体のFc領域のFc単球レセプターへの結合を通して与えられるかもしれない。これは次には、おそらく①28に対する膜タンパク質のB7ファミリーへの結合による同時刺激を与える。二重特異性F(ab')の共投与による細胞障害性T細胞のex vivo前活性化も報告されている(Mezzanzanicaら、Cancer Res., 51:5716) (1991)。

#### 【0009】

##### (発明の概要)

本発明は特定の腫瘍抗原または単一の分化組織型によって共有される抗原決定基に対して非常に高い特異性を有するモノクローナル抗体を得るための選抜方法を使用する。また、外部に露出し、安定で隠れていない抗原を好むモノクローナル抗体を作製することも目的である。ひとつの腫瘍または細胞株に由来する細胞抽出液に対して生じ、これらに対してスクリーニングされたモノクローナル抗体の問題の一つは、生きた非腫瘍組織とのその交叉反応性であるが、それはわずかである。免疫療法において観察される副作用の多くは、抗体または抗体-トキシン/薬剤/放射性核種結合物の正常非標的細胞との非特異的相互作用（関連する

障害性を生じさせる)に帰属できる。従って、副作用が最小化され僅かな症状に限定され、あるいは回避できる充分な特異性の抗体を提供することは本発明の重要な目的である。

#### 【0010】

従って、特定の細胞型の癌の細胞表面に提示されている共通抗原決定基に特異的な抗体の選抜において、細胞の混合物が調製され、その混合物は特定の組織型の複数の癌細胞に由来する個々の細胞株からの細胞を含むものである。この全細胞混合物は次に、異種ヒト腫瘍細胞で動物を免疫するための通常の免疫手順に従ってマウスのような実験動物に注射される。反応性B細胞は次にその動物から、好ましくは破壊された脾臓から回収され、ミエローマ細胞と融合されてハイブリドーマを形成する。統計学的分布関数によってウェルあたり1または2個のハイブリドーマが予測される決定的レベル以下に保つことにより、単離された单一ハイブリドーマを得る可能性が改善された。

#### 【0011】

クローニングおよび増殖後、分泌モノクローナル抗体を含む培地上清が取り出される。次に、最初に、特定の組織の癌細胞の混合物、および種々の組織型の癌細胞の混合物を、標的抗原決定基を提示している細胞への抗体結合が起こり得る条件下でモノクローナル抗体と接触させることにより、スクリーニングが行なわれた。次に、この抗体を認識する蛍光色素が添加され、次に細胞はフローサイトメトリーで評価されてどの細胞が検出可能な色素を有しどれがそうでないかが決定される。細胞型は放射光強度のlogスケールによって区別される。従って、細胞はその表面に結合した標識抗体を有する第1のクラスと、標識抗体が結合していない第2のクラスにランク付けされ、それによってフローサイトメトリーにおける細胞の二峰性分布が示される。

#### 【0012】

第2のスクリーニングは、更に二峰性分布を示す細胞に関するスクリーニングテストを含む。そのテストにおいては、前立腺癌の個々の細胞および他の癌起源の個々の細胞がモノクローナル抗体で標識される。従って、各癌細胞型はそれぞれ標識抗体でテストされ、注目している組織に由来する癌細胞との結合特異性を

有する抗体が同定される。前立腺癌由来細胞と不明瞭な反応性を示し、かつ非前立腺癌由来細胞と反応性を示さない抗体は更にテストされる。この方法が治療的応用において意図される癌組織型には、卵巣、乳房、ある種の内分泌腺（胸腺）、精巣、および前立腺のような身体の生存のために必須でない器官に由来する、またはそれらに生じるもののが含まれる。

#### 【0013】

第3のスクリーニングテストは、第1および第2のスクリーニングの両方をパスしたモノクローナル抗体に対して行われ、特定の細胞型の多数の癌に由来する組織切片（それと共に非相同組織からの正常組織切片という対照）に対する標識抗体の結合特異性を決定することを含む。

前立腺組織に対して特異的なモノクローナル抗体の産生を含む上記の方法のバリエーションにおいては、そこで述べた工程が繰り返されるが、但し、初期免疫感作は多数の前立腺腫瘍に由来する細胞株の全細胞懸濁混合物を調製することにより行われ、続いてハイブリドーマを増殖させる次のステップが行われるが、次に接種物に含まれる腫瘍細胞および前立腺起源でない細胞株由来の細胞の混合物に対して、標識抗体とのインキュベーション後に第1のスクリーニングテストを行う。手順中のこのバリエーションは正常前立腺と前立腺腫瘍細胞の両方に反応するが非前立腺細胞を認識しないモノクローナル抗体に対してはスクリーニングしない。

#### 【0014】

本明細書中の発明は、上記で開示した方法によって得られるモノクローナル抗体、およびまた、それらから作られる種々の診断又は治療用薬剤を包含する。特に有用であるのは、レポーター分子又は検出可能標識が化学的に抗体に結合した、または抗原結合特性およびもとの単離抗体の特異性を維持した抗体断片に結合した、抗体結合物である。これらのレポーターは、放射性同位元素や色素のように直接的であっても、酵素のように（酵素は統いて基質に作用し検出可能なシグナルを生成する）間接的であってもよい。診断においては、本発明の試薬は組織学的切片および免疫シンチグラフィーの評価において特に効果的である。

#### 【0015】

腫瘍細胞の根絶が求められている治療への応用においては、同じ抗体が意図した効果を生ずるが、それらが結合する腫瘍細胞の細胞死を誘導するために適合させた異なる結合分子を有する。細胞障害性分子には放射性核種、化学療法剤、または生物学的トキシンが含まれるであろう。診断応用においては、身体に広く分布した必須でない器官又は組織型の腫瘍細胞が免疫感作に使用されてよく、次に本方法によってスクリーニングされる。得られたモノクローナル抗体は治療目的で使用することができない。なぜなら、同じ型の正常組織が破壊されるであろうから。しかし、それらは、図4に表示した組織切片に関するような診断における試薬としては有用である。

#### 【0016】

出願人は、2種の抗原に結合する二重特異性構築物が1以上のエフェクター細胞の存在下で腫瘍細胞に対して細胞障害活性を有することを見いだした。この構築物は1以上のポリペプチドを含み、特定の非必須動物組織型の悪性および正常細胞上に発現している抗原決定基に対して結合特異性を有する第1の結合領域、および、単球、T細胞またはNK細胞のような免疫エフェクター細胞の特定のクラスの表面に発現している抗原決定基に対して結合特異性を有する第2の結合領域を有することを特徴とする。組織特異型の抗原決定基には、例えば、前立腺組織に対する5E10モノクローナル抗体によって認識される決定基が含まれる。本発明の方法により、その組織に対するモノクローナル抗体が単離されるかもしれない組織特異的抗原決定基を有する他の非必須組織には胸腺、甲状腺、乳腺、精巣、卵巣その他が含まれる。リンパ細胞マーカーに対するモノクローナル抗体は(商業的に入手可能なOKT3のような) CD3、CD4、CD8、CD16およびCD28、CD32およびCD64に向かうものであり得る。

#### 【0017】

最後に、本発明のまた更なる実施態様において、ハイブリッド-ハイブリドーマ細胞株が、OKT3分泌細胞(ATCCアクセッションNo.CRL 8001)と5E10前立腺組織特異的モノクローナル抗体分泌細胞と初めに融合させ、その融合ハイブリッドを選択培地中で増殖させることによって提供される。得られたハイブリッド-ハイブリドーマ細胞株はモノクローナル抗体OKT3抗体、5E10抗体および、一方の抗

体アーム上にOKT3の特異性およびもう一方の抗体アーム上に5E10の特異性を併せ持つ二重特異性抗体を分泌する。

### 【0018】

(好ましい実施態様の詳細な記載)

本モノクロナール抗体の開発における基本的なストラテジーは、特定の組織型に由来する全ての又は本質的に全ての腫瘍に共通の抗原決定基に対する特異性を有する抗体を選択する可能性を最大にすることである。このストラテジーに従って、複数、少なくとも2種類、および6~8までの腫瘍に由来する個々の細胞株を増殖させる。この細胞は洗浄され、通常の培地で全細胞密度約 $10^7$ 細胞/mlに濃縮され、試験動物、例えばマウスに注射される。この手順は免疫B細胞の回収のために脾臓の収集の前に一度繰り返される。

全ての細胞株抗原の同時提示は、全ての細胞株に対して共通の特異性を有する抗体を分泌するクローンの早期出現を生じさせるように見える。別の方は、第1の細胞株で免疫感作し、次に異なる細胞株でブーストすることであり、共通抗原決定基の連続的提示が個々の細胞株（これらは免疫系にただ一度提示される）に対して固有のものを過剰発現しているクローンを拡張すると期待するものである。この長く労力を有するアプローチは必要でない。なぜなら、出願人らは選択した全ての細胞株の同時接種は、2~3回の感作事象において共通の抗原に特異的なモノクロナール抗体産生クローンの出現を生じさせることを発見したからである。

### 【0019】

本明細書において用語「由来する」とは、細胞が患者から単離された腫瘍の2次培養によって得られることをいう。この語はリンパ系の非固形腫瘍から確立された細胞株にも適用される。腫瘍細胞の日常的2次培養技術はこの技術においてよく知られており、特定の組織型の要求により、成長因子、栄養素、支持マトリックス、およびホルモンの使用が含まれる。実験動物の免疫感作のための技術および続くハイブリドーマ作製のための脾臓B細胞の融合、および続いてのそれらの培養は通常のものである。本発明の実施に使用される基本的な手順は、Current Protocols in Immunology、第1巻、J.E.Coliganら編集、John Wiley & Sons:

1991(引用により本明細書に含まれるものとする)に詳しく述べられている。

#### 【0020】

本発明によるハイブリドーマの単離のためにこの手順を適用することに際して、96穴トレイの相当数のウェルが1~2のクローンを含みそれより多くは含まないよう融合細胞の適切な希釈が行なわれることが重要である。この目的を達成するために充分大きな希釈においては、およそ6~12%のウェルは0個のクローンを含む。クローン5E10が同定された実験においては、およそ20,000個の細胞が960プレートウェルに分配された。

フローサイトメトリーによるスクリーニングはいくつかの鍵となる利点を有している。第1に、安定な細胞表面抗原が同定されることが重要である。上に示したように、PSMAに向けられた7E11抗体および他の腫瘍特異的マーカーは細胞表面に向けられていない。細胞全体に結合する抗体のみを選抜することにより、安定な表面構成成分抗原を選択する可能性が増大する。用語「安定な」とは、抗体/細胞相互作用において、標的分子が好ましくは膜構造および膜の完全性に不可欠である構成的細胞膜糖タンパク質であり、細胞周期において隠され、置換され、あるいは抗原的に修飾される細胞の一過性の存在物でないことを意味する。

#### 【0021】

フローサイトメトリーによるスクリーニングの第2の利点は、二峰性特性はある細胞が蛍光団標識抗体に結合し他の細胞が結合しないことを示すことであり、このことが特異性の閾値指標であることである。もし、ただ一つの蛍光ピークのみが観察される場合は、そのことは腫瘍細胞と非前立腺細胞の両方に共通の抗原がその抗体によって同定されたことを意味する。2つのピークは1以上の腫瘍細胞サブセットが单一の抗原を有するか、1以上の腫瘍細胞サブセットが非腫瘍細胞と抗原を共有するが全てが共有するわけではないか、または、腫瘍細胞が正常細胞に共有されない抗原を有することを意味する。この予備選抜方法の他の利点は、細胞を標識する技術およびフローサイトメトリーのためにそれらを調製する技術はよく知られたものであり、日常的に行われ得るということである。

#### 【0022】

前立腺癌治療の場合、モノクローナル抗体が正常前立腺細胞と癌性前立腺細胞

とを区別しないとしても重要ではない。遠隔画像診断又は免疫治療が指示されている多くの場合、前立腺は既に除去されている。前立腺はそれが存在しないこと自体は生命を脅かすものではないという意味で必須ではない。実施例に開示されている5E10抗体は前立腺由来細胞一般に特異的であり、正常および癌細胞の両方に共通の前立腺マーカーを認識する。出願人らは、癌性および非癌性前立腺細胞の両方に共通であって、その分化細胞型に特異的である抗原が異種免疫系によって容易に認識され得るであろうことを正確に推測した。本発明の方法は与えられた細胞型について腫瘍特異的抗原に反応性の抗体を分泌するハイブリドーマの単離に適用することができるが、本明細書における好ましい態様は同じ細胞型から由来する正常組織および癌組織の両方に見いだされることがある細胞型特異的抗原を同定するために本方法を使用する。この技術は、動物の生存に必須でない前立腺以外の臓器（卵巣、乳房、精巣および胸腺はそのような器官の例である）について、そこから得られる正常細胞型およびその腫瘍対応物に共通の抗原決定部位に特異的な如何なるモノクローナル抗体を同定するために使用してもよい。

### 【0023】

本発明の抗体の診断目的の使用においては抗体は標識されなければならない。結合特異性と干渉しない如何なる抗体標識の通常手段も使用することができる。標識のための技術および診断用画像アッセイ形式化のための技術はMonoclonal Antibodies: Principles and Applications, J.R.. Birchら編集、Wiley-Liss: 1995 (引用により本明細書に含まれるものとする) およびそこに引用されている参考文献に述べられている。

治療目的の抗体の使用において、抗体と放射性核種、酵素、生物学的トキシン、および化学療法剤との結合物(conjugate)はこの技術分野でよく知られたものである。分子リンカーについてのより最近のストラテジーのいくつかはRiesfeldら、Antibodies as Therapeutic Agents and Carriers for Drugs, Pergamon Press:1990およびそこで引用されている参考文献に概説されている。治療作用についてはマイコトキシンが特に好ましい。なぜなら、それらの幾つかは細胞に対して極めて高い毒性を有し、導入(adoptive)スルフィドリル結合を介して可逆的に抗体に結合し得るものであり、遊離の分子としては独立の細胞結合レセプターを

有していないからである。本発明に有用な生物学的トキシンには、リシン、アブリン、アマンチン、トリコサンチン、およびレストリクトシンが含まれる。腫瘍部位にうまく局在することができる酵素には、Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, M.A. Ritterら編集、Cambridge University Press:1995に記載されているように、カルボキシペプチダーゼ、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、が含まれる。放射性核種の分子的結合および治療手順はTherapeutic Monoclonal Antibodies, C. Borrebaeckら編集、M Stockton Press:1990に詳しく記載されている。

## 【0024】

二重特異性抗体は種々の治療用途に使用されてきた。米国特許第5,601,819号(Wong)はCD3および、CD28またはインターロイキン2レセプター二重特異性抗体の特異的T細胞サブセットの増殖および破壊を選択的に生じさせるための組合せを使用を開示している。Belaniらは二重特異性IgGはB細胞リンパ腫モデルにおいて機能し、低用量ではT細胞の特異性を再ターゲッティングし、高用量では非特異的T細胞活性化を生じさせることを示した。bsF(ab')2も活性化T細胞によるT細胞媒介溶解を再ターゲッティングできることが見いだされた。従って、多くの応用例において、酵素消化断片のような抗体の部分は、その他の点では無傷の抗体について観察される効果を媒介するであろう。これらの断片は必ず可変軽鎖および重鎖抗体領域の相補性決定領域(CDR)を含んでおり、他のタンパク質断片に埋め込まれて二重特異性抗原結合タンパク質構築物を形成してもよい。この構築物は最小限、分散している定常骨格 $\beta$ シート部を含むCDRを有しているであろう。これらの領域は、米国特許第5,530,101号および第5,585,089(これらは引用により本明細書に含まれるものとする)に記載されているように日常的クローニングおよびシーケンシング方法に従って容易に同定される。クローニングは機能的可変領域の側方にある保存配列に相補的なPCRプライマーによって容易になる。

## 【0025】

エフェクター細胞に特異的なCDRと組織特異的抗原に対するCDRとを合わせた二重特異性抗体はヒト化されてもよく、マウス抗体の軽鎖および重鎖をそのヒト対応物に置換することによってもCDRをヒト抗体に移植することによってもよい。

これらの手順を実行するための方法は、米国特許第5,530,101号および第5,585,089号に含まれている。本発明の免疫構築物は二重特異性单鎖抗体であってもよく、これは典型的には米国特許第5,455,030号、第5,260,203号、および第4,496,778号（これらは引用によって本明細書に含まれるとする）に開示されているように、対応する可変重鎖部分にリンカー分子を介して共有結合した可変軽鎖部分からなる組換えポリペプチドである。 $Fc$ 部分を含む单鎖二重特異性抗体のためのより複雑な構築は米国特許第5,637,481号に詳細に与えられている。この型の構築物の主要な利点は、融合細胞ハイブリッド-ハイブリドーマ中の3種の別個の抗体型ではなく（これは更なる生成が必要である）、ただ1種の抗体が產生されることである。

#### 【0026】

二重特異性抗体の作製に他の方法も利用しえる。異なる特異性のインタクトな抗体又は抗体断片の化学的架橋によって化学的ヘテロ結合体が作製され得る。Karpovskyら、Production of Target-Specific Effector Cells Using Hetero-Cross-Linked Aggregates Containing Anti-Target Cell and Anti-Fc Gamma Receptor Antibodies, J. Exp. Med. 160:1686-1701 (1984)。しかし、これらの共結合体は再現可能な様式で作製することが難しく、通常のモノクローナル抗体よりも少なくとも2倍大きい。二重特異性抗体はジスルフィド交換によっても作製することができ、これは酵素的切断および抗体断片の再結合を含むものである。Glen nieら、Preparation and Performance of Bispecific F(ab')<sub>2</sub> Antibody Containing Thioether Linked Fab' Fragments, J. Immunology. 139:2367-2375 (1987)。他の方法は、短くしたFcによって転写因子FosおよびJunのロイシンジッパー領域に結合したF(ab')<sub>2</sub>の作製である。Kostelnyら、Formation of a Bispecific Monoclonal Antibody by the Use of Leucine Zippers, J. Immunol. 148:1547-53(1992)。

#### 【0027】

二重特異性抗体はハイブリッド-ハイブリドーマによっても產生することができる。ハイブリッド-ハイブリドーマは、2つのハイブリドーマ細胞株と一緒に融合して、得られるハイブリッド-ハイブリドーマが2種の豊富な軽鎖アレルを

有するようにすることによって作製できる。ハイブリッド-ハイブリドーマは、親のハイブリドーマによって產生される抗体によって認識される2つの別個の抗原の各々に対して単価である個々の二重特異性IgG分子を分泌する。しかしながら、ハイブリッド-ハイブリドーマは親のハイブリドーマによって認識される2種の抗原に対する二重特性抗体と單一特異性抗体の両方を产生する。更に、軽鎖／重鎖の忠実性は常に起こるわけではない。合計でハイブリッド-ハイブリドーマ細胞株によって产生され得る可能な重鎖と軽鎖の組合せが10種類ある。これらの一つだけが所望の二重特異性抗体である。従って、そのような二重特異性抗体を使用するに先だって、二重特異性抗体成分のある程度の精製が必要である。精製の好ましい方法はプロテインA免疫アフィニティクロマトグロフィーとそれに続くHPLC精製である。

#### 【0028】

好ましくは、本発明の抗-前立腺二重特異性抗体は標的細胞上の抗原決定基に特異的な第1のFab部分、もっとも好ましくは前立腺細胞に特異的である5E10と称する細胞株によって产生される抗体のFab部分を有している。第2のFab部分は免疫系エフェクター細胞上の抗原決定基に特異的なFab断片、最も好ましくはOKT3に由来するFab断片である。Fab部分は共通のFc領域を共有している。もっとも好ましくは、二重特異性抗体は、本発明のフローサイトメトリースクリーニング法によって選抜されるハイブリドーマ細胞株の融合によって形成されるハイブリット-ハイブリドーマ細胞株と免疫系エフェクター細胞上の抗原に対して特異的な抗体を产生するハイブリドーマとの融合によって产生される。好ましくは、第1のハイブリドーマ細胞株は前立腺細胞上に発現している抗原に特異性を有する5E10と名付けられた、ATCCアクセスション番号XXXXXである細胞株である。第2のハイブリドーマ細胞株は、CD16、CD28、およびCD3に対して特異的な抗体を発現している細胞株の群より選ばれてよく、好ましくはOKT3を発現している細胞株である(ATCC CRL 8001)。最も好ましくは、この二重特性抗体はATCCアクセスション番号XXXXXを有する細胞株によって产生される。

OKT3または一つのOKT3可変領域を有する二重特異性抗体によるCD3結合はCTLを部分的にしか活性化できない。CTLを完全に活性化して細胞障害性活性を有する

ようにするためには追加の共刺激シグナルが必要とされる。インタクトな二重特異性抗体は、Weinerら、J. Immunol., 152:2385(1994)に記載されているように、自身で共刺激シグナルを提供する能力を有する。

### 【0029】

本発明者らは、共刺激活性は二重特異性抗体のFc領域と循環している単球のFcレセプターとの相互作用を通して与えられるものであるという仮説をたてた。単球はその細胞表面上に共刺激分子のB7ファミリーのメンバーを発現している。これらのB7分子はCTLによって発現されているCD28に結合し、CTLの共刺激活性化を生じさせる。従って、二重特異性抗体は、実際に腫瘍細胞に対してCTLおよび単球をターゲッティングし得る。この経路はまた腫瘍部位における局所的サイトカイン放出を生じさせ、これは抗原陽性および抗原陰性腫瘍のいずれの退行にも寄与することがある。

本発明の他の利点は以下の実施例により明らかになるであろう。

### 【0030】

#### (実施例)

##### 実施例1

###### 免疫感作および融合

マウスを前立腺腫瘍細胞株の混合物で2回免疫感作した：初代細胞株：ALVA31、JCA1、ND1；転移性細胞株：DU145、LNCaP、およびPC3。マウスにPBS中の生細胞を、マウスあたり $12 \times 10^6$ 細胞（各細胞株 $2 \times 10^6$ ）を注射した。2度目の免疫感作の4日後に融合のために脾臓を取り出した。

2つの予備的融合において、細胞をウェルあたり100,000個および50,000個播き、ほぼ100%のウェルが前立腺および非前立腺細胞株と反応するモノクローナル抗体(mAb)の混合物を産生する複数のクローンを含んでいることが分かった。したがって、3回目の融合の後、ウェルあたり20,000細胞を10プレートに、すなわち、960ウェルに播いた。細胞の顕微鏡観察により、85ウェル(8.8%)は全くクローンを含まず、493ウェル(51.4%)は3以上のクローンを含み、382ウェル(39.8%)は1～2クローンを含むことが明らかになり、この最後のものをフローサイトメトリーで解析した。

### 【0031】

#### フローサイトメトリースクリーニング

工程1. 上清を表1に示した免疫感作に用いた6種類全ての前立腺細胞株および6種の非-前立腺細胞株を含む細胞混合物に添加した。この混合物中のいくつかの細胞と反応したが全てとは反応しなかった抗体（すなわち、12種の細胞株の混合物に対する二峰性染色を与えたもの、図1参照）を更なる評価のために選抜した。このアプローチによって、非-膜表面タンパク質を認識するモノクローナル抗体、または前立腺癌細胞に特異的でないエピトープを認識するモノクローナル抗体が排除された。反応の二峰性パターンを有する22ウェル（5.8%）をこのスクリーニング工程で同定した。

### 【0032】

工程2. 選抜した22の初期ウェルのハイブリドーマ細胞を96穴プレートから24穴プレートへ移し、細胞を数日間増殖させ、上清を前立腺細胞株および非-前立腺細胞株とそれぞれ（すなわち、全ての12株と）反応性をスクリーニングした。前立腺細胞と好ましい反応性を有する5種のハイブリドーマ集団をこの工程で選抜した（表1参照）。

### 【0033】

工程3. 5種の選抜したハイブリドーマの特異性を末梢血細胞（T-およびB-細胞、単球、顆粒球、赤血球、および血小板）、骨髄細胞、造血細胞および間質線維芽細胞の両方、および内皮細胞、初代培養細胞(HUVEC)および内皮細胞細胞株ECV-304両方について更に評価した。調べた5種の全てのハイブリドーマは解析した細胞型について陰性であることが分かった（表1）。

### 【0034】

工程4. ハイブリドーマ細胞をクローニングし、個々のクローンの反応性を前立腺および非-前立腺細胞株、末梢血液細胞、骨髄細胞、および内皮細胞に対して再度評価した（表1）。

工程5. 選抜したハイブリドーマクローンの反応性を更に組織サンプルの免疫組織学的染色によって評価した。5E10ハイブリドーマのみが6つの組織学的サンプルのうち6つの良性および悪性前立腺上皮と反応し、他の組織とは反応しないこ

とが分かった（表2）。5E10に関する免疫組織学的染色は標準的な標識ストレプトアビシン法を用いて種々の凍結切片で行なった。凍結切片を切り、冷アセトン中で5分間固定した。次に、切片を1次抗血清(5E10)で覆い、室温にて1時間インキュベーションし、リノンスした。次に、LSAB II Lind AB(Dako社; Carpinteria, CA)を用いて室温にて15分間切片を二次抗体で覆い、リノンスし、次に、LSA B II標識Abで室温にて15分間覆い、リノンスした。続いて切片を0.015%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む0.05%DAB/0.1M Tirsと共にインキュベーションし、1次抗体のシグナルを明らかにした。酸を用いずに10%Harrisヘマトキシリソカウンター染色を1~2分間行なった。1次抗体(5E10)を正常マウス血清に代えることにより陰性対照スライドを調製した。すべてのリノンスは1%BSA/PBSバファーを用いて行なった。

#### 【0035】

いくつかのクローンが同定され、それぞれ別個に（すなわち全ての12株について）前立腺細胞株および非-前立腺細胞株との反応性についてフローサイトメトリーによって評価した。最も興味深い、5E10と名付けられたクローンは6つの前立腺細胞株のうち4つ(DU145, PC3, ND1およびALVA31)を認識するIgG1を産生した。この抗体は前立腺癌の6つの組織学的組織サンプル中の6つにおいて良性および悪性前立腺と反応した。反応性は、悪性組織の方が強かった。非-前立腺腫瘍細胞、末梢血単球細胞あるいは骨髄ストロマ細胞との5E10の反応性はなかった。他の疾病で死亡した患者の剖検から多数の凍結正常組織が得られた。皮膚のある種の付属器構造、および、腎臓の間葉細胞の小集団と非常に弱い反応性が見られた。他の正常組織との反応性は見られなかつた。更に、5E10抗原は膜抗原であり、隠されるようにみえず、5E10によって認識されるエピトープは細胞外にある。ウェスタンプロット解析により、5E10抗原は分子量約115Kdを有する糖タンパク質であることが示された。この抗原をより深く探究する研究が進行中である。

#### 【0036】

5E10が膜貫通タンパク質であるか、またはホスファチジルイノシトールアンカー-膜タンパク質であるかを決定するために、細胞をホスファチジルイノシトールホスホリパーゼCで処理し、次に5E10モノクローナル抗体で染色した。この処理

が5E10の表面発現に影響を与えないことが示された。細胞溶解物のN-グリカナーゼ処理は分子量を115kDaから110kDaへ低下させた。続いてこの溶解物をノイラミニダーゼで処理すると更に分子量が20kDa低下した。

このように、5E10ハイブリドーマは6つの前立腺癌細胞の4つを認識し、良性および悪性前立腺と反応し、非-前立腺組織、末梢血血液細胞、骨髄造血細胞およびストロマ線維芽細胞、および内皮細胞と反応しないIgG1モノクローナル抗体を産生した。更に、5E10抗原は分子量110~115kDaを有する膜貫通糖タンパク質であり、N-結合オリゴ糖およびシアル酸残基を含むことが、図3に示したようにウエスタンプロットにより示された。図中、各細胞株の抽出物に対応するレーンは表1に示した反応性をもって5E10と反応する。

#### 【0037】

図4は更に5E10抗体の特異性を示すものである。前立腺組織切片を通常の凍結切片から調製し、5E10抗体を反応させた。間接蛍光標識により、モノクローナル抗体5E10の上皮細胞表面に対する特異性が明瞭に示された。この図はまた、この技術の器官特異的組織またはそのような器特異的細胞に由来する若しくはそこから生じた腫瘍細胞を同定する際の診断補助としての有効性を示すものである。

#### 【0038】

##### 【表1】

表1.

	1C2 (4 クローン) (2 クローン)	ハイブリドー マ 1A7	5E10 (3 クローン)	5D4 (4 クローン)	3C9 (3 クローン)
<b>標的</b>					
<b>1/前立腺細胞</b>					
株					
DU145	+	+	+	+	-
PC3	+	+	+	+	-
ND1	+	+	+	+	-
LNCaP	-	+	-	+	+
ALVA31	+	+	+	+	-
JCA1	+	+	-	-	-
<b>2/非-前立腺細胞</b>					
胞株					
A549 (肺)	+	+	-	-	-
SKLU1 (肺)	-	-	-	-	-
1072F (腎臓)	-	-	-	-	-
UIR1 (腎臓)	-	-	-	-	-
SKBR3 (乳腺)	-	-	-	-	-
5673 (膀胱)	-	-	-	-	-

【0039】

【表2】

表1. つづき

	1C2 (4クローン)	ハイブリドー マ1A7 (2クローン)	5E10 (3クローン)	5D4 (4クローン)	3C9 (3クロー ン)
3/未梢血細胞： TおよびB-リン パ細胞 単球 顆 粒球 赤血球 血 小板	—	—	—	—	—
4/骨髓： ストロマ細胞 線 維芽細胞 および 造血細胞	—	—	—	—	—
5/内皮細胞、 HUVEC および ECV-304	—	—	—	—	—

【0040】

【表3】

表2. 5E10による免疫組織化学染色結果

組織	検査した症例数	染色結果*
前立腺*		
良性	8	+
悪性	7	+
膀胱	3	-
骨格筋	5	-
平滑筋	5	-
肺	4	-
心臓	4	-
胃	5	-
大腸	5	-
睾丸	4	-
脾臓	4	-
皮膚	3	+/- (1)
神経	4	-
腎臓	8	-
肝臓	5	-
小腸	4	-
副腎	4	-

\* 染色結果：

＋ 陽性染色、

- 無染色、

1 皮膚の陽性染色は付属器構造に限定される

【0041】

## 実施例 2

### 5E10<sub>x</sub> 抗-CD3 BsAbの作製

二重特異性抗体を産生できるハイブリッド-ハイブリドーマは、5E10を分泌す

るハイブリドーマ細胞をOKT3を分泌するハイブリドーマと融合させることによって作製した（図5）。OKT3はヒトT細胞上のCD3レセプターと反応するIgG2aマウスモノクローナル抗体である。OKT3細胞株を作り出す細胞株はATCCアクセッショング番号CRL8001から得た。アミノプロテリンに感受性でネオマイシンに耐性のOKT3の変異体を作製した。ハイブリッド-ハイブリドーマは、HAT耐性ネオマイシン感受性5E10ハイブリドーマとHAT感受性ネオマイシン耐性OKT3-分泌ハイブリドーマの融合によって作製した。融合した細胞をHAT-ネオマイシン培地中にプレーティングしハイブリッド-ハイブリドーマを選抜した。この培地中のHATは未融合OKT3細胞の増殖を阻害し、ネオマイシンは未融合5E10細胞の増殖を阻害するであろう。従って、両方の親ハイブリドーマからの遺伝物質を含むハイブリッド-ハイブリドーマだけが生存する。BsAbを産生するハイブリッド-ハイブリドーマのパネルを作製した。

#### 【0042】

2段階スクリーニング法を用いてどのハイブリッド-ハイブリドーマ上清がBsAbを分泌しているか決定した。最初のスクリーニングにおいて、ハイブリッド-ハイブリドーマ上清を別々にPC3細胞またはJurkat (CD3発現ヒトT細胞白血病細胞)に添加した。ヤギ抗マウスIgG-FITCを、結合抗体の存在をWashington検出後に添加した。PC3とJurkat細胞の両方に結合できる抗体を分泌するハイブリッド-ハイブリドーマをさらなる研究のために選抜した。

第2のスクリーニングを使用して、BsAb含有上清がPC3およびJurkat細胞凝集の形成を誘導し得る能力を検出することにより二重特異的反応性を確認した。このアッセイにより、我々の実験室において他のBsAb分泌ハイブリッド-ハイブリドーマの最終選抜に関して成功することが分かった。細胞を緑色に染色する超生体膜色素DiOでPC3細胞を、同様な方法でJurkat細胞を赤色色素DiIで染色した。PC3およびJurkat細胞を抗体（ハイブリッド-ハイブリドーマ上清）と共に一緒に混合した。細胞を蛍光顕微鏡および二色フローサイトメトリーで評価した。

#### 【0043】

ハイブリッド-ハイブリドーマ上清が両方の細胞株に結合し得る機能的BsAbを含む場合、赤色および緑色蛍光によって検出されるような凝集形成の増加が見ら

れた。凝集の最も高い（单一特異性mAbを含む対照サンプルについて1.5%凝集であるのに対して7.5%凝集）割合を有するハイブリッドハイブリドーマ上清をさらなる研究のために選抜した。これらの結果は、リンパ細胞についての二重特異性抗体の開発において見られたのと同様である。

選抜したハイブリッドハイブリドーマを限界希釀よってサブクローニングし、二重特異反応性を確認した。二重特性抗体が大量に產生された。抗体含有上清はこのハイブリッドハイブリドーマの大量培養の上清から得られた。スタリフィロコッカスタンパク質Aを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、產生された抗体をこの上清から得た。この抗体産物をHPLCで分画し、生じた抗体ピークについて二重特異性抗体活性をスクリーニングした。

#### 【0044】

##### 細胞障害性アッセイ

*in vitro*において前立腺癌細胞の破壊を媒介できる能力についてBsAbを評価した。正常有志からの末梢血単球をエフェクター細胞として使用した。これらの細胞を50U組換えIL-2および $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製OKT3中で5日間培養した。ALVA31細胞を標準的方法によって $^{51}\text{Cr}$ で標識し、標的細胞として使用した。エフェクター細胞および標的細胞を、エフェクター：標的比を変えながら混合し、BsAbまたは单一特異性5E10、单一特異性OKT3または両者の組合せによって誘導される溶解と比較した。その結果は溶解ユニット（20%溶解）によって報告され、二重特異性抗体はT-細胞媒介溶解を再ターゲッティングすることが示された。

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は細胞数に対する $\log_{10}$ 蛍光の直線グラフであり、初代ハイブリドーマ上清とインキュベーション後の前立腺細胞および非-前立腺細胞株の混合物による表面発現のフローサイトメトリー解析を示したものである。結合した抗体はマウスIgに対するPE-標識ヤギ抗体で検出した。反応性の二峰性分布を有するハイブリドーマをさらなる評価のために選択した。

【図2】 図2は細胞数に対する $\log_{10}$ 蛍光の直線グラフであり、ヒト前立腺癌細胞株による5E10発現のフローサイトメトリー解析を示したものである。結

合した抗体はマウス Igに対する PE-標識ヤギ抗体で検出した。点線は無関係のマウス IgG1による対照を表す；実線は5E10発現を表す。

【図3】 図3は前立腺細胞株における5E10のウエウタンプロットである。細胞タンパク質溶解物を還元条件で4-20% SDS-PAGEで分離しニトロセルロース膜に転写し、5E10モノクローナル抗体で検出した。

【図4】 図4は前立腺組織の凍結切片であり、5E10の前立腺上皮細胞への高度に特異的な結合を間接免疫蛍光によって示したものである。

【図5】 図5は、単一特異性抗体と二重特異性抗体5E10/OKT3抗体との細胞溶解を比較した棒グラフである。

【図6】 図6は、ハイブリッドードーハイブリドーマによって分泌される抗体の各種の移動位置を示すHPLCプロットである。

【図1】

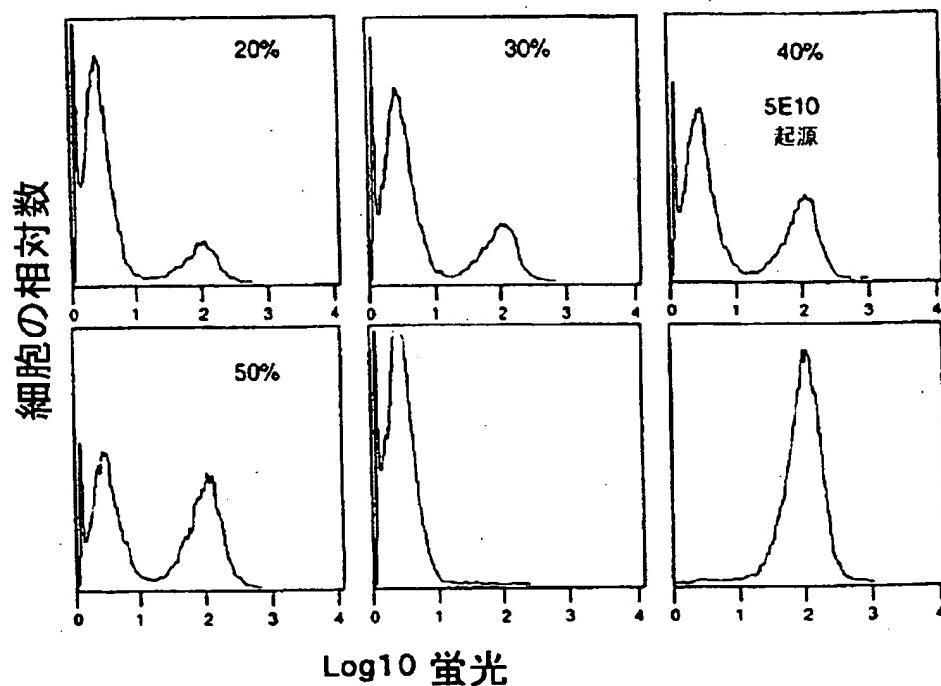


FIG. 1

【図.2】

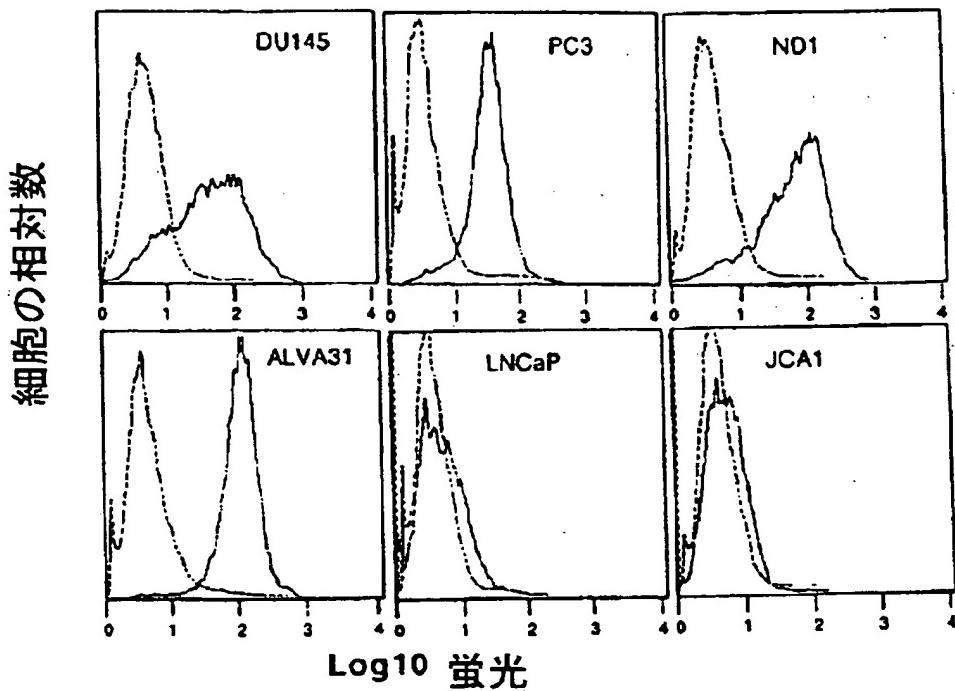


FIG. 2

【図3】

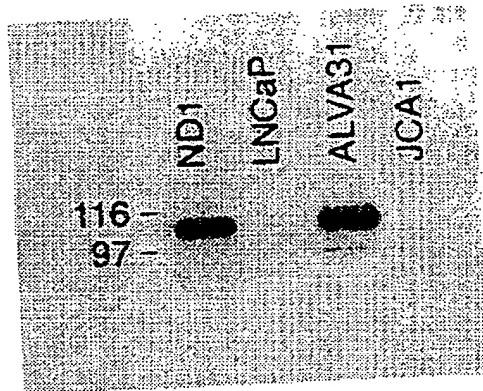


FIG. 3

【図4】



FIG. 4

【図5】

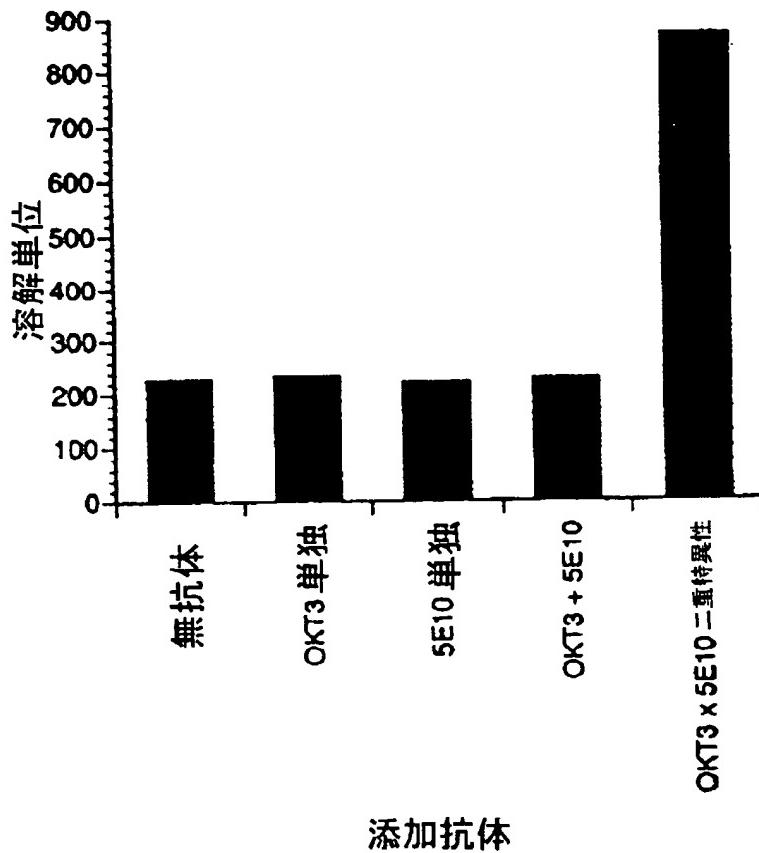
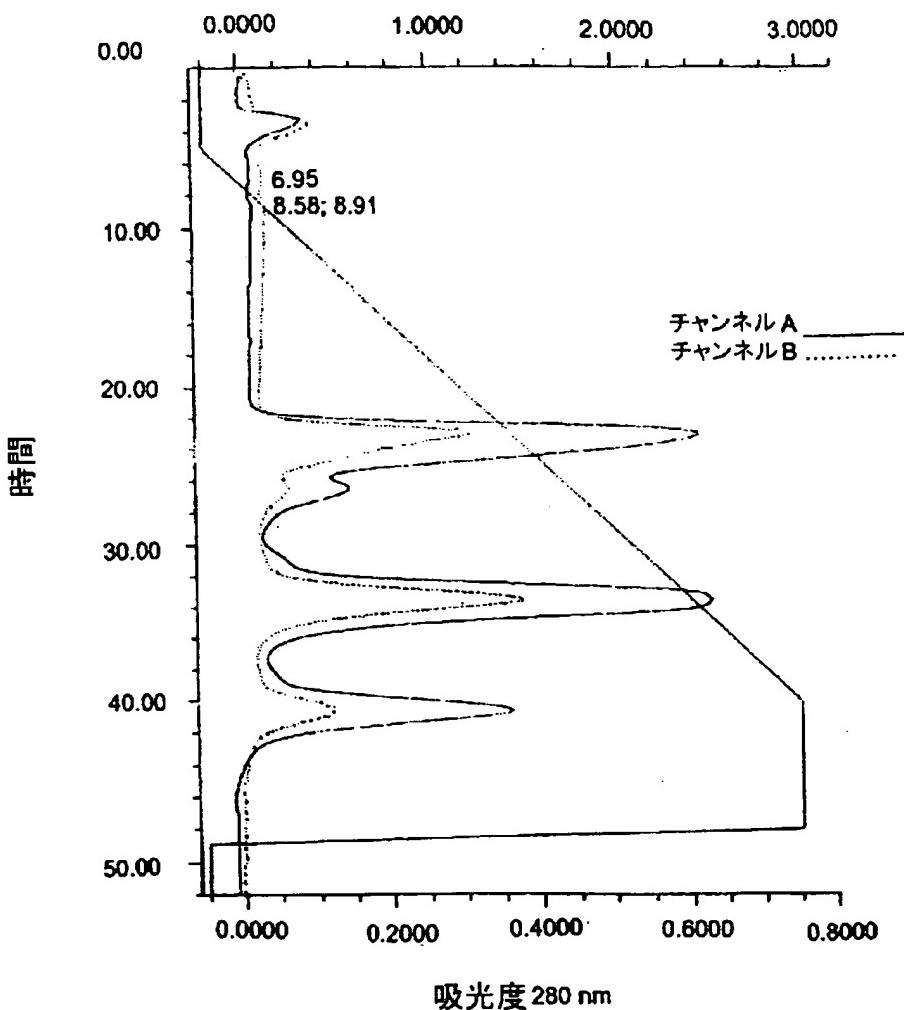


FIG. 5

【図6】

吸光度 214 nm



チャンネルB	時間	面積 %
	23.0	22.8
	33.5	42.0
	40.7	13.1

FIG. 6

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 99/13713

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC6: C07K 16/46, A61K 39/395, A61K 47/48, C12N 5/20 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: C12N, G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5489525 A (IRA H. PASTAN), 6 February 1996 (06.02.96), column 4, line 1 - line 21; column 4, line 28 - line 37; column 6, line 3 - line 7, column 6, line 64 - column 7, line 11, example 1	1,3,9-24
Y	--	2,4-6
A	WO 9803873 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.), 29 January 1998 (29.01.98), page 36 - page 37; page 42 - page 43	1-24
A	WO 9639185 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.), 12 December 1996 (12.12.96), page 32, examples 3 and 5 and claim 26	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" other document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reasons (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  <b>15 November 1999</b>	Date of mailing of the international search report  <b>04.02.2000</b>	
Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office P.O. 8016 Patentamt 2 ML-2289 MV Flensburg Tel: +49-70340-2040, Telex 651 600 NL Fax: +49-70340-3046	Authorized officer  <b>CARL-OLOF GUSTAFSSON/ELY</b>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 99/13713

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0268279 A2 (ONCOGEN), 25 May 1988 (25.05.88), page 12 - page 13  --	9-12
Y	Dialog Information Services, File 55, BIOSIS, Dialog accession no. 10918942, BIOSIS accession no. 199799540087, Katzenwadel Arndt et al: "Production and characterization of a bispecific antibody with specificity for the CD3 complex and the prostate specific antigen", Urological Research 25 (1): p 95 1997  --	1,2,4-6
Y	Dialog Information Services, File 55, BIOSIS, Dialog accession no. 11326355, BIOSIS accession no. 199800107687, Katzenwadel Arndt et al: "Production of a bispecific antibody with specificity for the CD3 complex and the prostate specific antigen as a possible tool for prostate cancer therapy", Tumor Biology 18 (SUPPL. 2): p 18 Sept., 1997  --	1,2,4-6
A	WO 9735616 A1 (PACIFIC NORTHWEST CANCER FOUNDATION), 2 October 1997 (02.10.97), page 25, line 31 - page 26; page 37, claim 64  --	1-24
Y	NATURE BIOTECHNOLOGY, Volume 15, July 1997, Philipp Holliger et al, "Retargeting serum immunoglobulin with bispecific diabodies" page 632 - page 636  --	1,2,4-6
Y	JOURNAL OF HEMATOThERAPY, Volume 4, 1995, Bart-Jan Kroesen et al, "Bispecific Monoclonal Antibodies for Intravenous Treatment of Carcinoma Patients: Immunobiologic Aspects" page 409 - page 414  --	1,2,4-6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 99/13713

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLOOD, Volume 81, No 12, June 1993, Brian K. Link et al, "Production and Characterization of a Bispecific IgG Capable of Inducing T-Cell-Mediated Lysis of Malignant B Cells" page 3343 - page 3349 -----	1

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. <b>PCT/US 99/13713</b>				
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>					
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li>     <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</li>     <li>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>					
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>					
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:</p> <p>see additional sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li>     <li>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</li> </ol>					
<p><b>Remark on Protest</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding-right: 10px;"><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.				
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.				

International Application No. PCT/US99/13713

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. Claims: 1-8

Bispecific antigen binding constructs with specificity for target cells surface antigen.

## 2. Claims: 9-12; 13-28

A method for producing a monoclonal antibody according to claims 9-12 and diagnostics or therapeutic agents or antibodies according to claims 13-28.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				SA 38863
				International application No. PCT/US 99/13713
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5489525 A	06/02/96	AU 5141193 A WO 9409150 A	09/05/94 28/04/94	
WO 9803873 A1	29/01/98	AU 3797697 A CA 2261018 A	10/02/98 29/01/98	
WO 9639185 A1	12/12/96	AU 5964996 A CA 2223291 A EP 0831904 A JP 11507509 T US 5773292 A	24/12/96 12/12/96 01/04/98 06/07/99 30/06/98	
EP 0268279 A2	25/05/88	AT 130029 T AU 613590 B AU 809487 A DE 3751585 D,T DK 606287 A ES 2080717 T GR 3018093 T HK 1007766 A IE 71154 B IL 84475 A JP 2597372 B JP 63279784 A NO 175944 B,C NZ 222509 A PT 86180 A,B US 5849876 A AU 610095 B AU 8126787 A ZA 8708637 A	15/11/95 08/08/91 09/06/88 25/04/96 20/05/88 16/02/96 29/02/96 00/00/00 29/01/97 21/06/92 02/04/97 16/11/88 26/09/94 26/03/93 01/12/87 15/12/98 16/05/91 26/05/88 18/05/88	
WO 9735616 A1	02/10/97	AU 2555297 A CA 2250141 A EP 0914155 A IL 126314 D	17/10/97 02/10/97 12/05/99 00/00/00	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/705		C 0 7 K 16/28	4 H 0 4 5
	16/28	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/574	Z
C 1 2 P 21/08		C 1 2 R 1:91)	
G 0 1 N 33/574		C 1 2 N 15/00	C
//(C 1 2 N 5/10		5/00	B
C 1 2 R 1:91)			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), E A(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ , TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB , BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, G H, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP , KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, M W, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD , SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW		
(72)発明者	ロックリン オスカー ダブリュー アメリカ合衆国 アイオワ州 52241 コ ーラルヴィル トゥエンティス アベニュー 一 1014		
(72)発明者	コーベン マイケル ビー アメリカ合衆国 アイオワ州 52245 ア イオワ シティ エヴァーグリーン ブレ イス 24		
F ターム(参考)	4B024 AA01 BA45 GA03 HA01 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA05 4B065 AA92X AA93X AB05 BA08 CA25 CA44 4C076 AA95 AA99 CC27 4C085 AA14 CC23 4H045 AA11 AA20 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74		